



## Il Polimorfismo

La stima della frequenza *multilocus* di genotipi è subordinata all'assunzione che:

- Gli alleli **in** ciascun locus sia ereditato indipendentemente (segua cioè l'equilibrio di Hardy-Weinberg)
- gli alleli **tra** i vari loci siano ereditati indipendentemente (situazione di "linkage equilibrium")



## Equilibrio di Hardy-Weinberg

Cause di deviazione e generazione di frequenze alleliche osservate diverse da quelle attese:

- deriva genetica (casuale) dovuta alla consistenza della popolazione (pochi individui) –errore di campionamento;
- deriva genetica (non casuale), con conseguente riduzione del grado di eterozigosi, dovuta a presenza di rapporti di parentela tra genitori;
- migrazione di geni tra popolazioni;
- mutazioni a carico di alleli;
- selezione naturale



## Struttura popolazione *Vitis vinifera*

- La vite è una popolazione “artificiale”
- Forti pressioni selettive arbitrariamente imposte dall’uomo, non necessariamente in equilibrio con l’adattabilità della pianta all’ambiente
- Propagazione vegetativa



## Il numero di genotipi aumenta esponenzialmente con il numero di alleli di un locus

$$\text{genotipi} = n(n + 1)/2$$

(dove n è il numero degli alleli)

$$n = 2$$

$$\text{genotipi} = 3$$

ovvero

numero di frequenze alleliche  
da stimare = 2

$$n = 6$$

ovvero

numero di frequenze alleliche (e quindi errore)  
da stimare = (3 volte maggiore)

ma

numero di genotipi = 21 (7 volte  
maggiore)



## Importanza della scelta di loci altamente polimorfici

Frequenza allelica (totale) = prodotto delle frequenze alleliche

Errore (totale) = sommatoria errori delle singole stime delle frequenze alleliche

locus con molte forme alleliche



↑ errore



genotipi



### Lista campioni

1. Sangiovese
2. Tinturier
3. Abrostine
4. Pugnitello
5. Cabernet Sauvignon
6. Alicante Bouchet
7. Colorino di Pisa
8. Colorino di Lucca
9. Raspi Rosso
10. Abrusco
11. Negrone Mazzini
12. Canaiolo CN/6
13. Canaiolo CN/8
14. "Ch6"

### Lista loci

1. VVS2
2. VVS4
3. VVS29
4. VVMD6
5. VVMD7
6. VVMD14
7. VVMD17
8. VVMD21
9. VVMD24
10. VVMD26





## Verifica delle risposte ottenibili con le analisi di Genetica di popolazione in funzione del

- N° di loci ----- **Variazioni su** -----> • numero di alleli
- N° di individui ----- **Variazioni su** -----> • eterozigosi attesa ed osservata;
- P.I. (probabilità di avere genotipi identici)



10 loci, 14 individui - 5 loci <sup>(i + informativi)</sup>, 14 individui - 5 loci <sup>(i - informativi)</sup>, 8 individui



locus	NA	NA	NA	Ho	Ho	Ho	He	He	He	P.I.	P.I.	P.I.
VVS2	5	5		0,57*	0,57		0,64*	0,64		0,29	0,29	
VVS4	4	4		0,78*	0,78		0,60*	0,60		0,29	0,29	
VVS29	3		2	0,78*		0,75	0,58*		0,57	0,54		0,61
VVMD6	3		2	0,75*		0,80	0,57*		0,53	0,41		0,61
VVMD7	5	5		1,00*	1,00		0,71*	0,61		0,25	0,25	
VVMD14	7	7		0,64*	0,64		0,73*	0,73		0,26	0,26	
VVMD17	2		2	0,71*		0,62	0,48*		0,46	0,61		0,60
VVMD21	4		3	0,57*		0,50	0,48*		0,42	0,39		0,49
VVMD24	4	4		0,26*	0,28		0,68*	0,68		0,27	0,27	
VVMD26	4		2	0,43*		0,50	0,67*		0,49	0,30		0,60
Totale	41	25	11									

\* - la differenza tra  $H_0$  ed  $H_E$  è significativa ( $p \leq 0,05$ )

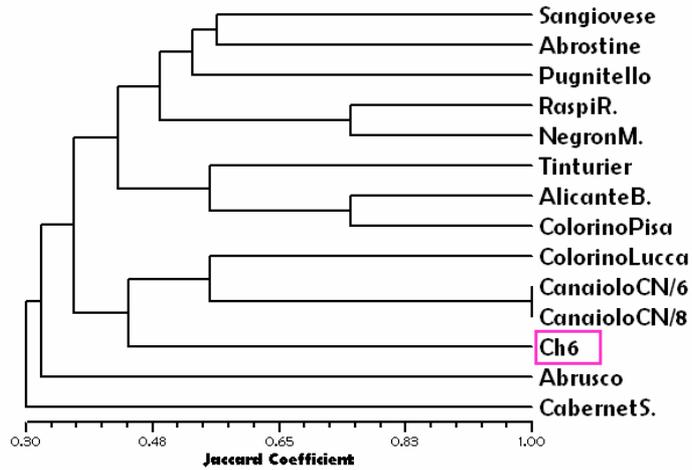


## 10 loci, 14 individui dendrogramma



### Dendrogramma per 10 loci - 14 accessioni

UPGMA

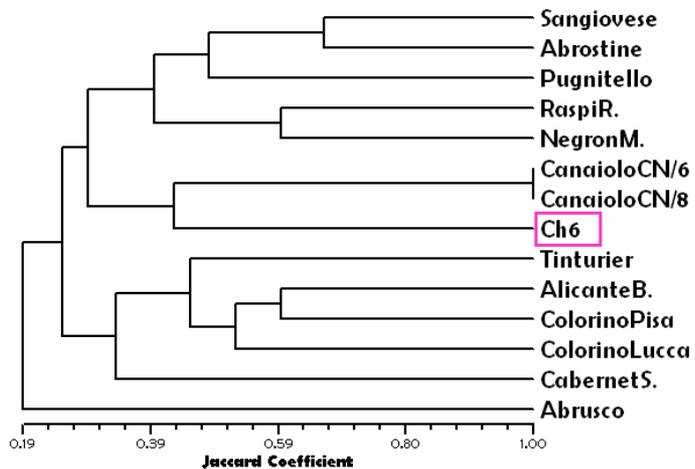


## 5 loci (i + informativi), 14 individui dendrogramma



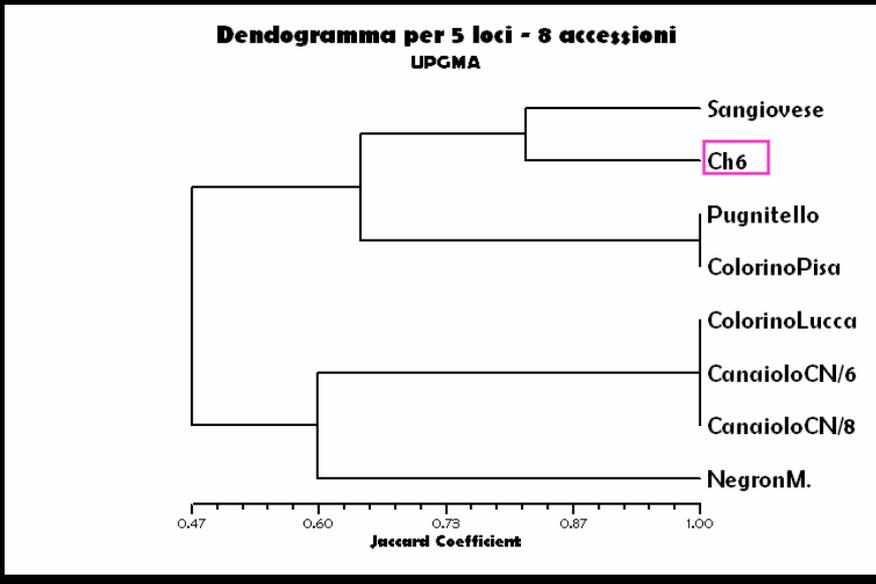
### Dendrogramma per 5 loci - 14 accessioni

UPGMA





## 5 loci (1 - informativi), 8 individui dendrogramma



## Test di Paternità



Anche in questo caso la forza dei test risiede nella **FREQUENZA ALLELICA** e **NUMERO** dei loci analizzati nella popolazione di studio, e nella **NATURA** della popolazione stessa.



## Test di Paternità



### CASO 1: uno dei due genitori è noto

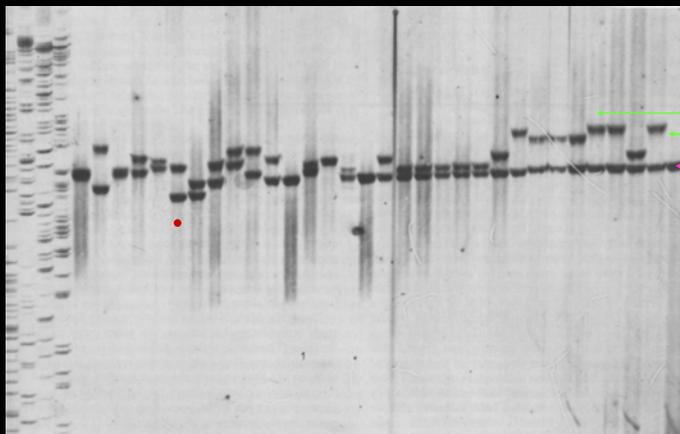
- individuazione dell'allele ricevuto dal genitore ignoto (allele discriminante)
- ricerca di tale allele nel genitore putativo

### CASO 2: nessuno dei due genitori è noto

- individuazione del profilo allelico dell'individuo esaminato
- ricerca di una combinazione di genitori che consentano la ricostruzione del profilo della discendenza, per ciascun locus, sulla base della segregazione mendeliana



## Microsatelliti: analisi dei polimorfismi



Sauvignon blanc  
Cabernet franc  
C. Sauvignon

VVMD7



## Test di Paternità IL LIMITE: L'UNICA CERTEZZA E' L'ESCLUSIONE

un grande numero di individui può essere escluso, con certezza\*, attraverso l'analisi dei microsatelliti

MA

non ci sono, talvolta, abbastanza informazioni per attribuire la discendenza ad una coppia di genitori

\* (valendo l'ipotesi di assenza di mutazioni)



## Test di Paternità IL LIMITE: L'UNICA CERTEZZA E' L'ESCLUSIONE

NON-MATCH → Condizione  
NECESSARIA e  
SUFFICIENTE per  
negare l'ipotesi

MATCH → Condizione  
NECESSARIA, ma  
NON SUFFICIENTE  
per affermare  
l'ipotesi



## Paternity Index (o likelihood ratio)

Probabilità che il genitore putativo abbia trasmesso il suo allele al discendente nei confronti di quella di un individuo *random* appartenente alla stessa popolazione

PI = probabilità che il genitore putativo possa aver trasmesso l'allele, fratto la frequenza dell'allele discriminante



## Paternity Index Approccio Bayesiano

Nel 18° secolo il matematico Bayes sviluppò un teorema per la stima della probabilità che un evento accada quando non esiste la possibilità di misurarlo direttamente o quando non ci sono alcune informazioni sulla natura dell'evento

$$PI \text{ (Bayes)} = \frac{X \cdot p}{X \cdot p + y (1-p)}$$

X: probabilità che l'ipotesi si verifichi; y che non si verifichi

p: probabilità a priori che X si verifichi; 1-p che non si verifichi

Forte adattabilità del metodo al campo vegetale dove non è possibile avere nessuna evidenza se non quella fornita dallo stesso genotipo.



## Probability of paternity

È la probabilità a posteriori della paternità

$$\text{Probability of paternity} = \frac{PI}{PI + 1}$$

Solitamente si assume che il valore di probabilità a priori sia di 0,5 (50%)-in realtà la stima della probabilità di paternità dovrebbe tenere in considerazione i valori reali di probabilità a priori-EVIDENZA GENETICA

Il PI dovrebbe essere almeno di 100 per avere 99% di probabilità di accuratezza nella stima della probabilità di paternità, assumendo le probabilità a priori di 0,5



## Il caso "Ch6"

- A. 10 loci, 14 individui
- B. 6 loci, 14 individui
- C. 3 loci (i + informativi), 14 individui
- D. 3 loci (i - informativi), 14 individui

A. : non si rilevano combinazioni di genitori possibili per il "Ch6"

B.-C.-D. : si rilevano numerose combinazioni possibili per il "Ch6", 2 le più probabili:

- Sangiovese x Canaiolo
- Sangiovese x Colorino di Lucca



## B. 6 loci, 14 individui



Ambedue le combinazioni hanno:  
alto **Paternity Index** versus una coppia di genitori random nella popolazione

La combinazione **Sangiovese x Canaiolo**,  
tuttavia, mostra:  
i più alti valori anche negli altri parametri misurati



## B. 6 loci, 14 individui



Genitori putativi del "Ch6"	XxY	(1)xX	rel(2)x(1)	(2)xX	rel(1)x(2)
Sangiovese X Pugnitello	5,43	1,01	0,94	7,06	2,21
Sangiovese X Colorino di Pisa	5,43	1,01	0,94	2,82	1,48
Sangiovese X Colorino di Lucca	10,90	2,02	1,35	3,95	1,72
Sangiovese X Negron Mazzini	2,72	0,54	0,69	2,82	1,48
Sangiovese X Canaiolo CN/6-8	10,90	2,02	1,35	5,65	2,07
Pugnitello X Colorino di Pisa	2,72	3,53	1,41	1,41	1,09
Pugnitello X Colorino di Lucca	5,43	7,06	2,02	1,98	1,27
Pugnitello X Negron Mazzini	1,36	1,77	1,04	1,41	1,09
Colorino di Pisa X Colorino di Lucca	5,43	7,06	2,02	1,98	1,27
Colorino di Pisa X Negron Mazzini	1,36	1,77	1,04	1,41	1,09
Colorino di Pisa X Canaiolo CN/6-8	2,72	3,53	1,69	1,41	1,10
Colorino di Lucca X Negron Mazzini	2,72	2,47	1,21	2,82	1,56
Negron Mazzini X Canaiolo CN/6-8	1,36	3,53	1,69	0,71	0,80

Calcolato su tutti i loci



**B. 6 loci, 14 individui**  
**C. 3 loci** (i + informativi), **14 individui**  
**D. 3 loci** (i - informativi), **14 individui**

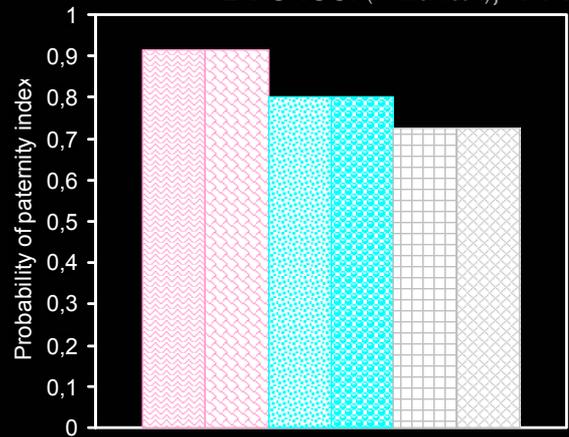
Genitori putativi del "Ch6"	XxY	(1)xX	rel(2)x(1)	(2)xX	rel(1)x(2)
Sangiovese X Colorino di Lucca	10,90	2,02	1,35	3,95	1,72
Sangiovese X Canaiolo CN/6-8	10,90	2,02	1,35	5,65	2,07
Sangiovese X Colorino di Lucca	4,07	2,02	1,36	1,02	1,30
Sangiovese X Canaiolo CN/6-8	4,07	2,02	1,36	1,02	1,30
Sangiovese X Colorino di Lucca	2,67	1,00	0,99	1,96	1,32
Sangiovese X Canaiolo CN/6-8	2,67	1,00	0,99	2,80	1,58

Calcolato su tutti i loci



**Probability of paternity**

**B. 6 loci, 14 individui**  
**C. 3 loci** (i + informativi), **14 individui**  
**D. 3 loci** (i - informativi), **14 individui**



- Sangiovese x Colorino di Lucca
- Sangiovese x Canaiolo CN/6-8
- Sangiovese x Colorino di Lucca
- Sangiovese x Canaiolo CN/6-8
- Sangiovese x Colorino di Lucca
- Sangiovese x Canaiolo CN/6-8

2 combinazioni - 3 elaborazioni



## I dati molecolari e la selezione clonale

- Sulla base della analisi molecolari si può ragionevolmente ipotizzare che Ch6 mostra una similarità genetica maggiormente elevata con Canaiolo, rispetto agli altri vitigni analizzati
- E' altamente probabile ipotizzare che Ch6 discenda dall'incrocio Sangiovese-Canaiolo
- E' plausibile omologare Ch6 come nuova varietà? E' corretto omologare CH6 come Sangiovese?
- Caso dell'Aleatico



## Prospettive di ricerca

Ulteriore approfondimento  
delle applicazioni  
molecolari alla  
vitivinicoltura

Sviluppo di marcatori  
connessi alla fisiologia  
della vite

Genomica funzionale

